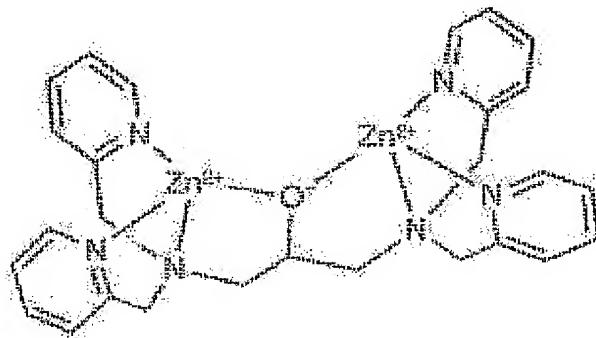


**METHOD FOR DETECTING PROTEIN PHOSPHATASE ACTIVITY ON CHIP****Publication number:** JP2007228905 (A)**Publication date:** 2007-09-13**Inventor(s):** INAMORI KAZUNORI**Applicant(s):** TOYO BOSEKI**Classification:**- **international:** C12Q1/42; C12Q1/42- **European:****Application number:** JP20060056191 20060302**Priority number(s):** JP20060056191 20060302**Abstract of JP 2007228905 (A)**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for profiling especially kinetics in various protein phosphatases comprehensively by detecting the phosphorylation of substrate peptide by a simple procedures rapidly by using an inexpensive substance and without requiring a specific technology. ; **SOLUTION:** This method for detecting the protein phosphatase activity by detecting the phosphorylation of the peptide or protein immobilized on a substrate plate is characterized by effecting e.g. a chelating compound described in formula (I) on the phosphorilated peptide or protein, and then detecting the de-phosphorylation by using a fluorescence or chemical luminescence. ;

**COPYRIGHT:** (C)2007,JPO&INPI



(I)

---

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-228905

(P2007-228905A)

(43) 公開日 平成19年9月13日 (2007.9.13)

(51) Int.Cl.

C 12 Q 1/42

(2006.01)

F 1

C 12 Q 1/42

テーマコード (参考)

4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号

特願2006-56191 (P2006-56191)

(22) 出願日

平成18年3月2日 (2006.3.2)

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 稲森 和紀

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡  
績株式会社内

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QQ33 QQ61 QR13  
QR41 QR84 QX02

(54) 【発明の名称】チップ上におけるプロテインフォスファーゼ活性の検出方法

(57) 【要約】

【課題】安価な物質を用いて迅速でしかも特別な技術を必要としない簡易な手法により基質ペプチドのリン酸化を検出することにより、特に種々のプロテインフォスファーゼにおける動態を網羅的にプロファイリングできる方法を提供する。

【解決手段】基板上に固定化されたペプチドもしくは蛋白質のリン酸化を検出する方法であって、リン酸化されたペプチドもしくは蛋白質に、例えば式 (I) に記載されるようなキレート性化合物を作用させた後、蛍光もしくは化学発光を用いて脱リン酸化を検出することを特徴とするプロテインフォスファーゼ活性の検出法。

【化1】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

基板上に固定化されたペプチドもしくは蛋白質の脱リン酸化を検出する方法であって、ペプチドもしくは蛋白質が固定化されている基板にキレート性化合物を作用させた後、蛍光もしくは化学発光を用いてリン酸化を検出することを特徴とするプロテインfosfataーゼ活性の検出方法。

## 【請求項2】

キレート性化合物がポリアミン亜鉛錯体であることを特徴とする請求項1記載のプロテインfosfataーゼ活性の検出方法。

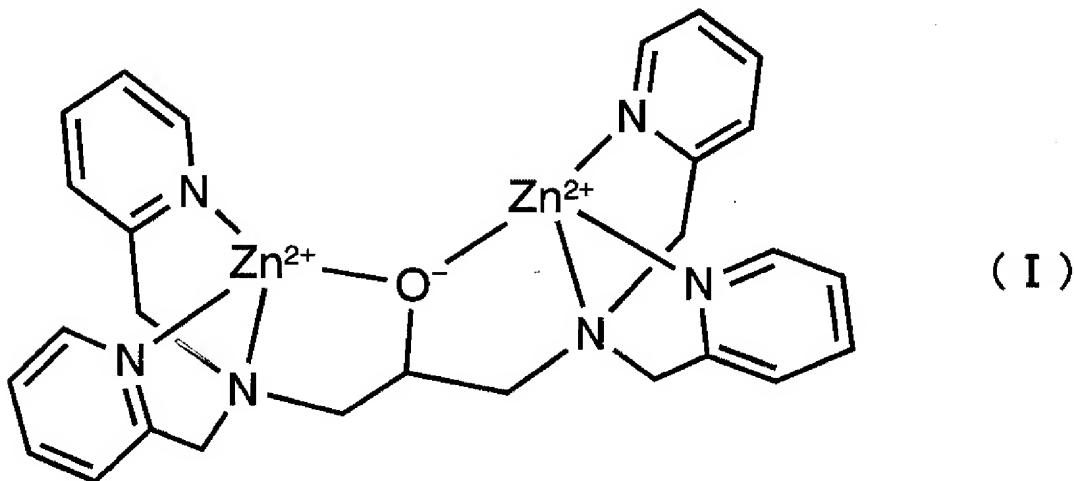
## 【請求項3】

キレート性化合物がポリアミン化合物を配位子として有する二核亜鉛錯体であることを特徴とする請求項1又は2に記載のプロテインfosfataーゼ活性の検出方法。

## 【請求項4】

キレート性化合物が式(I)に記載される化合物であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載のプロテインfosfataーゼ活性の検出方法。

## 【化1】



## 【請求項5】

基板がガラスであることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載のプロテインfosfataーゼ活性の検出方法。

## 【請求項6】

表面が金であることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載のプロテインfosfataーゼ活性の検出方法。

## 【請求項7】

末端にシステイン残基の付加されているペプチドが固定化されてなることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載のプロテインfosfataーゼ活性の検出方法。

## 【請求項8】

キレート性化合物に蛍光性物質もしくは化学発光性物質により修飾された化合物を用いることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載のプロテインfosfataーゼ活性の検出方法。

## 【請求項9】

キレート性化合物にビオチンで修飾された化合物を用い、かつ蛍光性物質もしくは化学発光性物質により修飾されたアビジンもしくはストレプトアビジンを作用させることを特徴とする請求項1～8のいずれかに記載のプロテインfosfataーゼ活性の検出方法。

## 【請求項10】

ビオチンで修飾されたキレート性化合物と蛍光性物質もしくは化学発光性物質により修飾されたアビジンもしくはストレプトアビジンとの複合体を用いることを特徴とする請求項1～9のいずれかに記載のプロテインfosファターゼ活性の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、基板上にペプチドもしくは蛋白質が1もしくは複数種固定化されてなるアレイを用いたプロテインfosファターゼ活性の解析方法であって、アレイ上でリン酸化されたペプチドもしくは蛋白質にキレート性化合物を作用させ、蛍光もしくは化学発光を用いて検出することによりプロテインfosファターゼ活性を検出する方法に関する。本発明により、迅速で効率的であり、しかも簡便に網羅的なプロテインfosファターゼ活性の解析を実現することができる。

【背景技術】

【0002】

近年、細胞内シグナル伝達に関する研究は飛躍的に進歩しており、増殖因子やサイトカインにより活性化した細胞表面の受容体からどのように核へシグナルが伝達されるかはもとより、細胞周期、接着、運動、極性、形態形成、分化、生死などを制御する様々なシグナル伝達経路の実態が明らかになってきた。これらのシグナル伝達経路は独立して機能しているのではなく、互いにクロストークしあい、システムとして機能している。そして、癌をはじめ色々な疾病の原因が、これらのシグナル伝達経路の異常として説明されるようになってきた。

【0003】

上述したシグナル伝達経路においては、蛋白質のリン酸化修飾に関する様々な種類のプロテインキナーゼが複雑に関連しあいながら重要な役割を果たしていることが知られている。同時に、リン酸化された蛋白質の脱リン酸化を触媒するプロテインfosファターゼについても重要な位置づけを占めている。これらプロテインfosファターゼの活性を網羅的に解析して、その細胞内における動態を一度にプロファイリングすることができれば、細胞生物学、薬学の基礎的研究はもとより、創薬開発、臨床応用などの分野においても大きく寄与しうるものと期待される。しかしながら、これまでには簡便で効率よく種々のプロテインfosファターゼにおける動態を同時にプロファイリングできるような技術は、未だ確立されていないのが現状である。

【0004】

例えば、蛍光部分を有するプロテインfosファターゼの基質ペプチドを用いた蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により、プロテインfosファターゼ活性を確認する方法が報告されている(特許文献1)。また、リン酸化ペプチド由来のシグナルについてマススペクトル測定することで、リン酸化部位の解析を行う方法が示されている(非特許文献1)。更に、<sup>32</sup>Pを用いた方法も古くから行われている(非特許文献2)。しかしながら、これらの方法はいずれもスループット性が低く、網羅的な解析を行ううえでは十分なものとはいえない。

【0005】

【特許文献1】特表2005-538164号公報

【非特許文献1】Rapid Commun. Mass Spectrum., 第17卷、第1493～1496頁(2003年発行)

【非特許文献2】プロテインキナーゼとホスファターゼ(株式会社メディカル・サイエンス・インターナショナル発行)第172～188頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、安価な物質を用いて迅速でしかも特別な技術を必要としない簡易な手法によりペプチドもしくは蛋白質の脱リン酸化を検出することにより、特に種々のプロテインフ

オスファターゼにおける動態を網羅的にプロファイリングできる方法を確立しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記事情に鑑み銳意検討を重ねた結果、基板上にプロテインキナーゼを認識するペプチドもしくは蛋白質が固定化されてなるアレイを用いて、リン酸化されたペプチドもしくは蛋白質にキレート性化合物を作成させ、蛍光もしくは化学発光を用いてリン酸化を検出する方法が、様々なプロテインキナーゼ動態を迅速に特に網羅的な解析を行う上で極めて有用であることを見出し、本発明に到達した。

【0008】

本発明は、以下のような構成からなる。

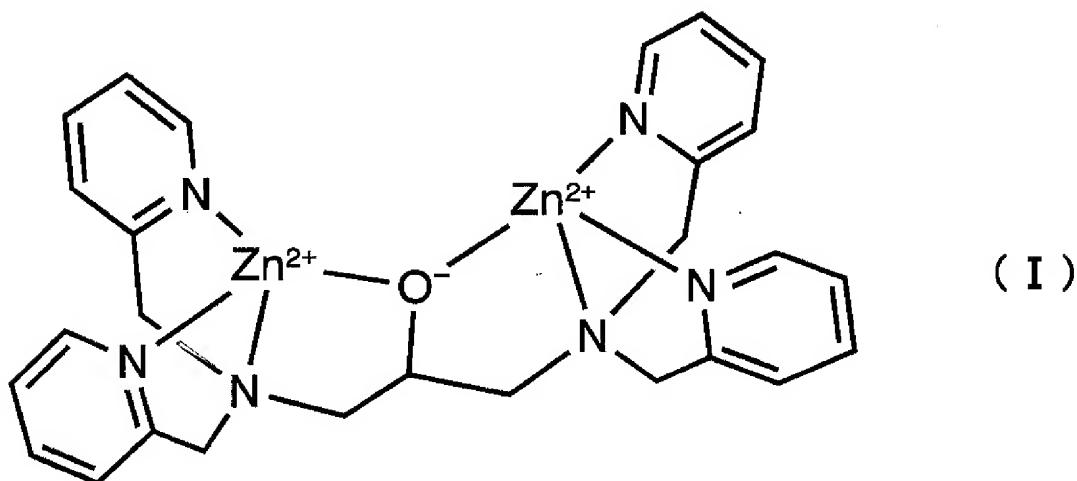
( 1 ) 基板上に固定化されたペプチドもしくは蛋白質の脱リン酸化を検出する方法であつて、ペプチドもしくは蛋白質が固定化されている基板にキレート性化合物を作成させた後、蛍光もしくは化学発光を用いてリン酸化を検出することを特徴とするプロテインfosfotyrosine活性の検出方法。

( 2 ) キレート性化合物がポリアミン亜鉛錯体であることを特徴とする( 1 )のプロテインfosfotyrosine活性の検出方法。

( 3 ) キレート性化合物がポリアミン化合物を配位子として有する二核亜鉛錯体であることを特徴とする( 1 )又は( 2 )のプロテインfosfotyrosine活性の検出方法。

( 4 ) キレート性化合物が式( I )に記載される化合物であることを特徴とする( 1 )～( 3 )のいずれかのプロテインfosfotyrosine活性の検出方法。

【化1】



( 5 ) 基板がガラスであることを特徴とする( 1 )～( 4 )のいずれかに記載のプロテインfosfotyrosine活性の検出方法。

( 6 ) 表面が金であることを特徴とする( 1 )～( 5 )のいずれかのプロテインfosfotyrosine活性の検出方法。

( 7 ) 末端にシステイン残基の付加されているペプチドが固定化されてなることを特徴とする( 1 )～( 6 )のいずれかのプロテインfosfotyrosine活性の検出方法。

( 8 ) キレート性化合物に蛍光性物質もしくは化学発光性物質により修飾された化合物を用いることを特徴とする( 1 )～( 7 )のいずれかのプロテインfosfotyrosine活性の検出方法。

( 9 ) キレート性化合物にビオチンで修飾された化合物を用い、かつ蛍光性物質もしくは化学発光性物質により修飾されたアビジンもしくはストレプトアビジンを作成させることを特徴とする( 1 )～( 8 )のいずれかに記載のプロテインfosfotyrosine活性の検出方法。

( 10 ) ビオチンで修飾されたキレート性化合物と蛍光性物質もしくは化学発光性物質に

より修飾されたアビジンもしくはストレプトアビジンとの複合体を用いることを特徴とする(1)～(8)のいずれかのプロテインfosファターゼ活性の検出方法。

#### 【発明の効果】

#### 【0009】

本発明の方法により、特殊な技術を要することもなく、非常に簡便で迅速に様々なプロテインfosファターゼの動態の解析を行うことが可能となった。キレート化合物を用いることにより、安価で取り扱いも容易であるうえに、リン酸化アミノ酸の種類やその近傍のアミノ酸配列により依存されない点でも従来の方法と比べて大きな優位性がある。本発明を利用することにより、特に多種類のプロテインfosファターゼシグナルを網羅的に解析することができ、機能が未知な遺伝子の導入、あるいは薬物投与に伴う細胞内のプロテインfosファターゼ動態を効果的にプロファイリングすることができる。これにより新規な遺伝子からの機能解析、新薬探索へのアプローチといったゲノム創薬への展開が期待される。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0010】

本発明における基板上のリン酸化されたペプチドもしくは蛋白質の検出方法としては、従来からよく知られているような蛍光性物質もしくは化学発光性物質を利用して行う。蛍光性物質は特に限定されるものではなく、あらゆる蛍光性化合物が適用される。例えば、FITC, 6-FAM, Cy3, Cy5, Texas Red, TAMRA, APCなど一般的な蛍光アッセイに際して用いられるものが例示される。また、化学発光性物質を用いる場合についても特に限定されるものではなく、例えば、ルミノール、ルシゲリン、ロフリンなど一般的な化合物が例示される。

#### 【0011】

本発明において、基質として用いられるペプチドもしくは蛋白質はプロテインfosファターゼの動態を網羅的にプロファイリングすることが目的であるので、1種類のペプチドもしくは蛋白質は1種類のプロテインfosファターゼによってのみ脱リン酸化され、他のプロテインfosファターゼによっては脱リン酸化されないのが理想であり好ましい。プロテインfosファターゼの基質となるアミノ酸配列は公知であるか、公知の配列に基づき適宜選択することが可能である。本発明のアレイがその動態の把握を必要とする複数のプロテインfosファターゼの種類に対応した種類のペプチドもしくは蛋白質を固定化していれば、1枚のアレイで全てのプロテインfosファターゼのプロファイリングをすることが好ましい。もちろん1つのアレイに1種のみのプロテインfosファターゼに対応するペプチドもしくは蛋白質を固定化し、必要な数のアレイを使用してプロテインfosファターゼのプロファイリングを行ってもよい。

#### 【0012】

本発明において用いられるアレイの基板としては、ガラスが最も一般的で好ましいが、ポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリカーボネート、アクリルなどのプラスチック類も挙げることができる。透明なガラスは容易に入手しやすく、汎用性の点でも特に有利である。ガラス基板を用いる場合、ガラスの種類や基板の厚さは特に限定されるものではないが、厚さとしては0.1～20mm程度が好ましく、例えば1～2mm程度の基板が用いられる。大きさや形状に関しても特に限定されるものではないが、一般に普及されているアレイ解析装置への対応性を考慮すると、通常市販されているスライドガラスのサイズと同じものを用いるのが好ましい。

#### 【0013】

基板表面に関しては、例えばガラス表面に公知の方法に基づいてシランカップリングのような化学修飾を行い、官能基を導入されたものを用いることができる。具体的な官能基としては、アミノ基、カルボキシル基、チオール基、エポキシ基などが挙げられる。あるいは、基板の表面が金属薄層でコーティングされていてもよい。コーティングされる金属の種類としては、金、銀、白金などが例示されるが、酸・アルカリ・有機溶媒などに非常に安定性の高い金が好ましい。金を用いる場合、上述したような官能基を末端に有してな

るようなアルカンチオール化合物を用いることによる表面化学の改質に関しては、その実績や知見も数多く報告されていることからも、金表面に対して官能基を容易に導入する事ができる点で有用である。

#### 【0014】

金属、特に金をコーティングする場合、その方法は特に限定されるものではないが、一般的に蒸着法、スパッタリング法、イオンコーティング法などが選択される。金属薄層の厚みをナノレベルでコントロールするのが好ましい。金属薄層の厚みも特に限定されるものではないが、一般的には20～100nm、好ましくは30～80nmの範囲で選択される。また、金属薄層の剥離を抑制するために、0.5～10nm程度、好ましくは1～5nm程度のクロム層やチタン層を予め基板にコーティングしておいてもよい。

#### 【0015】

本発明において、ペプチドもしくは蛋白質とは、複数のアミノ酸が縮合結合されて連結された通常のポリペプチド全般を指すものである。プロテインファイリングの対象となるプロテインフォスファターゼとしては、リン酸化された蛋白質のセリン、スレオニン、チロシンなどのアミノ酸を脱リン酸化する酵素が挙げられ、例えばPP1、PP2A、PP2B、PP2C、PTP $\beta$ 、RPTP-BK、SHP-2、TC-PTP、などが例示できるが、基本的にはあらゆる種類のプロテインフォスファターゼに関して適用することが可能である。

#### 【0016】

これら該プロテインフォスファターゼの基質となるペプチドもしくは蛋白質は公知のものであってもよいが、アミノ酸配列は公知の配列に基づき適宜選択することも可能である。ペプチドを用いる場合の長さは一般的に100アミノ酸残基以下のものが用いられるが、好ましくは30アミノ酸残基、より好ましくは8～25アミノ酸残基、更に好ましくは10～20アミノ酸残基程度からなるものが用いられる。また、蛋白質を用いる場合の分子量は特に限定されるものではない。上記ペプチドもしくは蛋白質の生成手法は特に限定されるものではなく、化学的もしくは遺伝子工学的な公知の手法により生成することが可能である。本発明においてプロテインフォスファターゼの基質となるペプチドもしくは蛋白質とは、該プロテインフォスファターゼにより脱リン酸化反応を受ける性質を有するペプチドもしくは蛋白質をいうものである。

#### 【0017】

本発明においては、ペプチドもしくは蛋白質が上述したような基板上に固定化されたアレイを用いる。ペプチドもしくは蛋白質は、プロテインフォスファターゼの基質として機能しうるようなアミノ酸配列を含有するものを少なくとも1つ、好ましくは異なる種類のプロテインフォスファターゼにより脱リン酸化を受けるアミノ酸配列のものを複数種が用いられる。更には、あるいはネガティブコントロールも同じ基板上に固定化されているのが好ましい。合成のしやすさ、取り扱いやすさ、保存安定性などの点では、比較的低分子量のペプチドを用いる方がより好ましい。

#### 【0018】

本発明に用いられるアレイにおけるペプチドもしくは蛋白質の基板への固定化方法に関しては特に限定されるものではなく、ポリペプチド配列において存在するアミノ基やチオール基を介した方法、あるいはHISタグ、GSTタグ等を用いる方法など様々な様式が挙げられる。

#### 【0019】

J. M. BrockmanらによりJ. Am. Chem. Soc. 第121巻、第8044～8051頁(1999年)において報告されているような方法に基づいて、アルカンチオール層を介して固定化し、PEG(ポリエチレンジリコール)によりバックグラウンドを修飾する方法を用いてもよい。また、非特異的な影響をより抑えるために、PEGの末端に上述のような官能基が導入された誘導体をアルカンチオールに結合させた後に、ペプチドを固定化することも、スペーサー効果を奏する点で有用である。

#### 【0020】

具体的には、例えば金属薄膜にカルボキシメチルデキストランあるいはカルボキシル基で末端が修飾されたPEGのような水溶性高分子を結合させて表面にカルボキシル基を導入して、EDC(1-エチル-3,4-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド)のような水溶性カルボジイミドを用いてNHS(N-ヒドロキシスルホニミド)のエステルとして、活性化されたカルボキシル基にペプチドもしくは蛋白質のアミノ基を反応させる方法が挙げられる。あるいは表面をマレイミドにより修飾した後、システインのようなチオール基を含むアミノ酸残基を介して固定化してもよい。この場合のシステイン残基はペプチドの一方の末端に付加されてなるのが好ましい。非特異的な影響を低減させるためには、後者のチオール基を介した固定化方法がより好ましいが、特に限定されるものではない。

#### 【0021】

上述したHiss-tagやGSTのようなタグを付加したペプチドを固定化する方法も非常に簡便で有用である。この場合には、上述のように金属表面にアルカンチオールを介してアミノ基やカルボキシル基を導入した後に、それぞれNTA(ニトリロ三酢酸)、グルタチオンを金属薄膜上に導入させておくのがよい。Hiss-tagの場合は、NTAを導入したアレイを塩化ニッケルにより処理した後で基質を固定化する。

#### 【0022】

上述した方法の中では、特にチオール基を介してペプチドを固定化する方法が、特異性、感度の両面から特に好ましい。この場合には、システイン残基を介して固定化を行うのが好ましい。

#### 【0023】

固定化されるペプチドのアミノ酸配列において少なくとも1箇所以上のシステイン残基が存在することが好ましい。システイン残基は固定化されるペプチドが本来の機能を奏するために必要なアミノ酸配列として必須な残基として存在している場合であっても、あるいはペプチドが本来の機能を奏するために必要なアミノ酸配列に対してさらに付加された場合であってもよい。固定化されるペプチドにおけるシステイン残基の存在位置は特に限定されないが、好ましくは少なくとも一方の末端に、より好ましくは一方の末端のみに付加されてなる方がよい。一方の末端にシステイン残基を付加させる場合、システイン残基のみを付加してもよいが、固定化されたペプチドの自由度を上げることにより作用させる物質との相互作用の効率を高めるためにスペーサーとして1乃至数残基のアミノ酸配列をさらに付加させてもよい。スペーサー部分のアミノ酸配列は特に限定されないが、なかでもグリシン残基及び/又はアラニン残基もしくはセリン残基が1乃至数個の配列を付加させることが特に好ましい。あるいは、末端のシステイン残基と基質配列との間には、上述のようなアミノ酸配列の替わりに例えばPEG(ポリエチレンジリコール)のような親水性高分子が挿入されていてもよい。

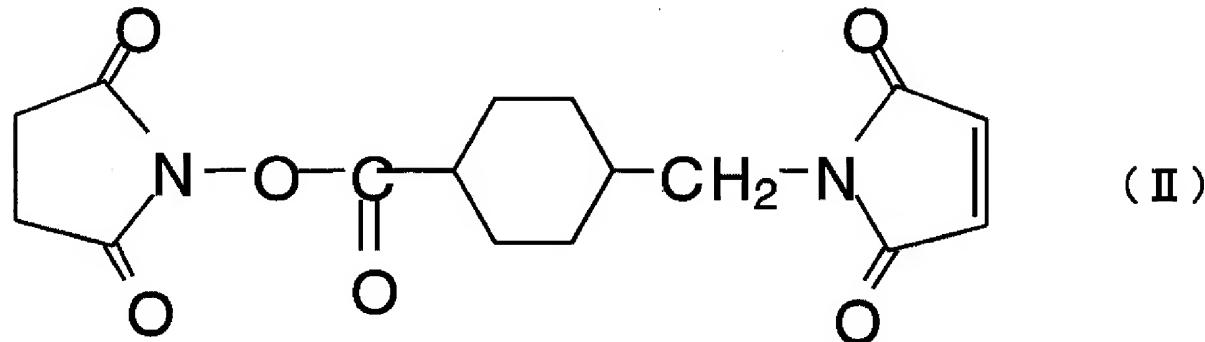
#### 【0024】

上述のように、チオール基を介してペプチドを固定化する場合、ヘテロ二官能基型リンカーを導入するのが好ましい。ヘテロ二官能基型リンカーの化学構造は特に限定されるものではないが、予めアミノ基を表面に導入した後、スルホニミド(NHS)基もしくは硫酸スルホニミド基とマレイミド(MAL)基を有するヘテロ二官能型架橋剤を用いることが特に好ましい。このようなヘテロ二官能型架橋剤としては、ポリエチレンジリコール(PEG)のような親水性高分子の両端がNHS基とMAL基で修飾されたものを用いることも可能であるが、ペプチドの固定化収率を向上させるためには、より低分子量のものを用いてもよい。具体的には、式(I I)に示す化合物succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate(以下、SMCCと示す。)もしくは式(I I I)に示す化合物succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate(以下、SSMCCと示す。)が挙げられる。なお、式(I I)もしくは式(I I I)に示す化合物と完全に同一構造のものだけを指すのではなく、その機能を損なわない範囲でアナログ化された化合物をも包含される。また、

本発明においてはSMCC及びSSMCCのいずれも適用することが可能であるが、水に対する溶解性の点からは、緩衝液のような水系で反応させる場合においてはSSMCCを用いる方がより好ましい。

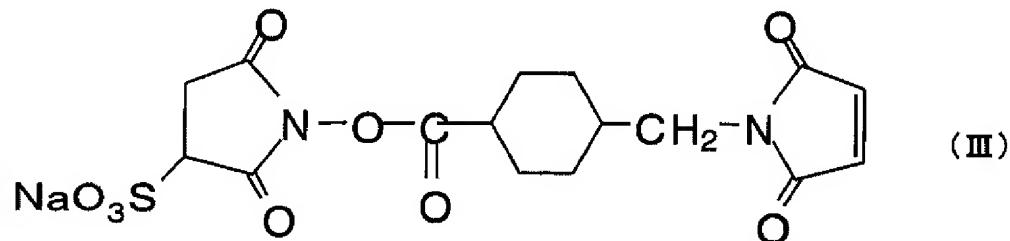
【0025】

【化2】



【0026】

【化3】



【0027】

PEGのような親水性高分子の両端がNHS基とMAL基で修飾されたものを用いる場合、特にサイズは限定されるものではない。好ましくは、例えば分子量が500～5000程度であることが好ましく、より好ましくは800～2000程度、更に好ましくは600～1200程度のものが用いられる。

【0028】

上述のように表面に官能基が導入された基板上にペプチドもしくは蛋白質溶液を作用させてアレイを作製するが、その際にはマニュアル操作で行うことも可能ではあるが、自動スポットターのようなスポットティング装置を用いて行う方が好ましい。自動スポットターの形式や種類は特に制約されるものではなく、一般的に普及されているようなスポットティング装置を用いることが可能である。スポットの大きさについても特に限定されないが、1～1000μm程度が好ましく、10～600μmがより好ましく、100～500μmが更に好ましい。スポットするペプチドもしくは蛋白質溶液は、PBSのような緩衝液に溶解させたものを用いるのが好ましいが、DMSO(ジメチルスルホキシド)のような有機溶媒を適当な比率で混合してあるいはそのまま用いてもよい。

【0029】

プロファイリングの対象となるプロテインfosファターゼは市販されているような試薬であってもよいが、細胞由来の抽出液中に既に含まれる、もしくは含まれると推定されるものを用いることも可能である。例えば、バッファーもしくは細胞抽出液または両者混合液中にプロテインfosファターゼ試薬もしくは細胞抽出液中に既に含まれるプロテインfosファターゼを加えたものを直接アレイに作用させることにより固定化基質のリン酸化を行うことができる。脱リン酸化の条件はプロテインfosファターゼの種類により

変動するが、通常は10~40°C程度、好ましくは20~40°C程度の温度で5分~8時間程度、好ましくは10分~5時間程度反応させることで、ペプチドもしくは蛋白質を脱リン酸化することができる。

## 【0030】

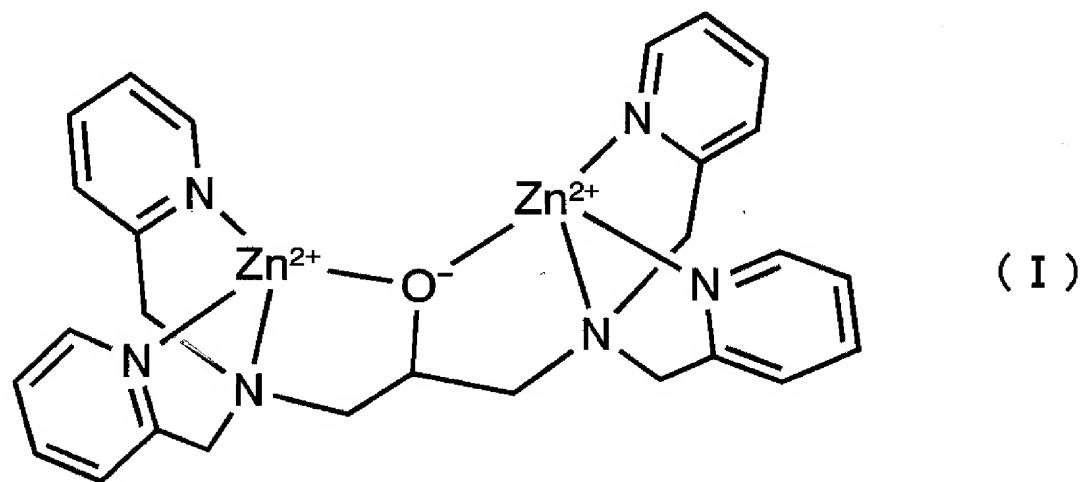
本発明においては、アレイ上における基質の脱リン酸化を特異的に感度よくモニターするため、リン酸基に対して特異的な結合性を有するキレート化合物を用いることを特徴とする。そして、キレート化合物の結合量が低下する様子をモニターすることにより、脱リン酸化を検出するものである。特に、蛍光もしくは発光の量の消光する様子を直接的もしくは間接的にモニターすることにより検出することが好ましい。キレート化合物とは一般に多座配位子ないしキレート試薬が、亜鉛、鉄、コバルト、パラジウムのような金属イオンに配位して生じた錯体をいうものを指すが、特にリン酸に選択的かつ可逆的に結合する性質を有する化合物が好ましい。キレート化合物として、上述したような蛍光性物質もしくは化学発光性物質により修飾されたものを直接用いてもよい。なかでも、ポリアミン亜鉛錯体を用いることがより好ましい。ポリアミン化合物を配位子として有する二核亜鉛錯体を用いることが更に好ましい。更に、二核亜鉛(I I)錯体を基本構造にもつヘキサアミン二核亜鉛(I I)錯体を用いることがより好ましい。

## 【0031】

このような化合物の典型としては、式(I)に示されるような1,3-ビス[ビス(2-ピリジルメチル)アミノ]-2-ハイドロキシプロパンオラート(IUPAC名:1,3-bis[bis(2-pyridylmethyl)amino]-2-propanolatodizinc(I I) complex)を基本骨格とするポリアミン化合物を配位子として有する二核亜鉛錯体(ただし、プロパンオール骨格の水酸基はアルコラートとして二つの亜鉛2価イオンの架橋配位子になっている)が挙げられるが、本発明は特にこの化合物に限定されるものではない。

## 【0032】

## 【化4】



## 【0033】

上述した錯体化合物は、一般的な化学合成技術を利用して合成することが可能であるが、市販の化合物を原料としても合成することができる。例えば、上記式(I)で示される化合物( $Zn_2 L$ )は、市販の1,3-ビス[ビス(2-ピリジルメチル)アミノ]-2-ハイドロキシプロパンと酢酸亜鉛を原料として次の方法により合成することができる。1,3-ビス[ビス(2-ピリジルメチル)アミノ]-2-ハイドロキシプロパン4.4mmolのエタノール溶液(100ml)に10M水酸化ナトリウム水溶液(0.44ml)を加え、次いで酢酸亜鉛二水和物(9.7mmol)を加える。溶媒を減圧留去することにより褐色のオイルを得ることができる。この残渣に水10mlを加えて溶解後、1

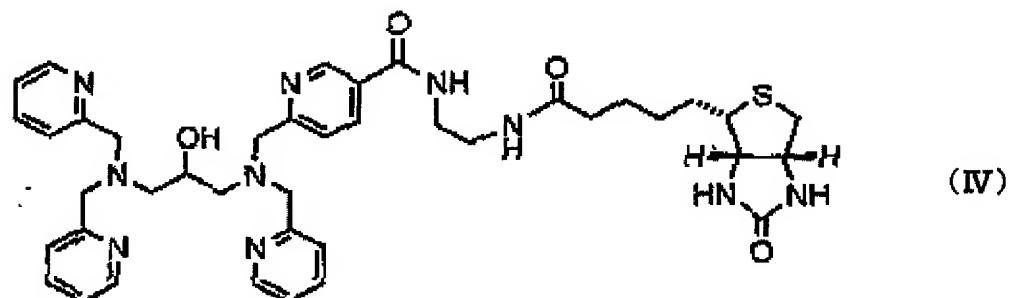
M過塩素酸ナトリウム水溶液(3当量)を70°Cに加温しながら滴下して加え、析出する無色の結晶を沪取し、加熱乾燥することにより式(I)の構造式で表される酢酸イオン付加体の二過塩素酸塩( $Zn_2L-C_2H_5COO^- \cdot 2C_2O_4^- \cdot H_2O$ )を高収率で得ることができる。この結晶は一分子の結晶水を含んでいる。

## 【0034】

本発明においては、上述のようなポリアミン亜鉛錯体がビオチンにより修飾されたものを用いてもよい。直鎖状もしくは分岐状のリンカー構造を介してビオチン修飾されていることがより好ましい。リンカー構造の分子量としては500~1000の範囲であり、より好ましくは600~900、更に好ましくは700~900である。具体的には、式(IV)に示されるような構造のものが例示されるが、特に限定されるものではない。ビオチン修飾されたポリアミン亜鉛錯体の分子量が1000を超えると、安定性も悪くなり、リン酸への結合効率の点からも好ましくない。

## 【0035】

## 【化5】



## 【0036】

上記の場合に、作用されるビオチン修飾ポリアミン亜鉛錯体の溶液濃度は特に限定されないが、通常は $1\mu M$ ~ $10\mu M$ 、好ましくは $10\mu M$ ~ $1M$ 、より好ましくは $10\mu M$ ~ $10mM$ の範囲である。またアレイへの作用様式に関しても特に限定されないが、ビオチン修飾ポリアミン亜鉛錯体溶液をアレイ表面全体に広がるのに必要な液量をドロップしてもよいし、溶液中にアレイを浸漬させてもよい。あるいはポンプを用いて溶液を送液しながら、アレイ表面上に溶液を接触させることにより作用させてもよい。作用温度は室温でもよいし、 $20\sim40^\circ C$ 程度の一定温度でインキュベートさせてもよい。作用時間は10分から2時間程度が好ましく、30分から1時間程度がより好ましい。

## 【0037】

本発明においては、ビオチン修飾ポリアミン亜鉛錯体を作用させた後、更にアビジンもしくはストレプトアビジンのようなレセプターを作用させることが好ましい。ストレプトアビジンを作用させる方がより好ましい。作用させるアビジンもしくはストレプトアビジンの濃度は特に限定されないが、通常は $1\mu M$ ~ $10\mu M$ 、好ましくは $10\mu M$ ~ $1M$ 、より好ましくは $10\mu M$ ~ $10mM$ の範囲である。またアレイへの作用様式に関しても特に限定されるものではなく、ビオチン修飾ポリアミン亜鉛錯体の場合と同様である。その場合、アビジンもしくはストレプトアビジンに、上述したような蛍光性物質もしくは化学発光性物質により標識されているものを用いてもよい。

## 【0038】

あるいは、アビジンもしくはストレプトアビジンを作用させた後に、更にアビジンもしくはストレプトアビジンを認識する抗体を作用させることにより、検出感度を更に高めることが可能になる。その際に上述したような蛍光性物質もしくは化学発光性物質により標識されているものを用いるのが好ましい。抗体を作用させる際の濃度は特に限定されないが、好ましくは $0.01\sim10\mu g/m^1$ 、より好ましくは $0.1$ から $\mu g/m^1$ 程度である。抗体としてはモノクロナール抗体、ポリクロナール抗体いずれも適用できるが、特異性の点でモノクロナール抗体の方が好ましい。アレイへの作用様式に関しても特に限定

されるものではなく、ビオチン修飾ポリアミン亜鉛錯体、アビジンもしくはストレプトアビジンの場合と同様である。

## 【0039】

また、ビオチン修飾ポリアミン亜鉛錯体、アビジンもしくはストレプトアビジンを順次作用させてもよいが、予めビオチン修飾ポリアミン亜鉛錯体とアビジンもしくはストレプトアビジンの複合体を形成させたものを直接作用させてもよい。この場合も上述のように、さらにアビジンもしくはストレプトアビジンを認識する抗体を作成させてもよい。複合体の形成に際しては、ビオチン修飾ポリアミン亜鉛錯体とアビジンもしくはストレプトアビジンとのモル比にして1:1乃至4:1にして反応させるのがよい。反応物は精製して未反応物を除去する方が好ましいが、反応物をそのまま適用することも可能である。

## 【0040】

こうしたキレート性化合物の適用は、上述したような方法により非常に安価に合成することができる点で有利である。また常温により保存ができる点でも安定で使いやすく、流通面においても有利である。またリン酸化されるアミノ酸残基の種類に関係なく作用することや、リン酸化されたアミノ酸の近傍におけるアミノ酸配列に対して反応が依存しない点において、特に抗体を用いて検出する方法と比較して大きな優位性を有している。

## 【0041】

また、上記プロテインフォスファターゼとしては、種々のチロシンフォスファターゼあるいはセリン/スレオニンフォスファターゼが挙げられる。これらプロテインフォスファターゼの種類については特に限定されるものではなく、基本的にはあらゆる種類のプロテインフォスファターゼに対して適用することが可能である。

## 【実施例】

## 【0042】

以下、実施例を挙げることにより、本発明をより具体的に説明するが、本発明は実施例に特に限定されるものではない。

## 【0043】

## (ペプチド固定化)

スライドグラス（松浪硝子工業製S1226；サイズ：26mm×76mm×1mm）に金を蒸着処理した金スライド（コート内容：1層目 クロム20Å、2層目 金450Å）を、1mM濃度の8-Amino-1-octanethiol, hydrochloride（同仁化学製）のエタノール溶液中に室温で1.5時間浸漬させた。こうしてアミノ基表面を形成させた。この金スライドを、エタノール及び水で洗浄して乾燥を行った後、0.4mg/ml濃度のSSMCC（Pierce製）溶液（150mM NaClを含む10mM リン酸バッファー；pH 7.4に溶解して調製した。）を各々のガラス基板上のペプチドを固定化する領域を覆うように、300μlをドロップして溶液を広げて、室温で15分間置反応させた。こうして、基板上にマレイミド基表面を形成させることができた。その後ガラス基板をエタノール、水の順で洗浄し乾燥させた。

## 【0044】

乾燥後、ガラス基板上に基質となる合成ペプチド（以下、基質ペプチドとも示す。）をスポットター（東洋紡績製Multi SPRinter（登録商標）自動スポットター）を用いて10nLずつスポットし、湿度を保った状態で、室温で16時間静置して基質ペプチドを固定化させた。用いた基質ペプチドは、配列表に示したアミノ酸配列のものであり、図1に各基質ペプチドの固定化された配置を示した。No.1, 2（配列番号1）はチロシンフォスファターゼであるPTPβの基質ペプチド（リン酸化チロシン含有）をそれぞれ100μg/ml、10μg/ml濃度でのスポット、No.3, 4（配列番号2）はセリンフォスファターゼであるPP2Aの基質ペプチド（リン酸化セリン含有）をそれぞれ100μg/ml、10μg/ml濃度でのスポット、No.5, 6（配列番号3）はPP2Aの基質ペプチドのネガティブコントロール（非リン酸化セリン含有）をそれぞれ100μg/ml、10μg/ml濃度でのスポットである。いずれのペプチドも末端にシステイン残基が付加されており、このシステイン残基の有するチオール基が、基板表面

のマレイミド基とカップリング反応することにより基板上に基質ペプチドが固定化されるものである。基質ペプチドの固定化パターンは図1に示す通りである。基質ペプチド溶液は、150 mM NaCl及び1 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(東京化成工業製)を含む10 mM リン酸バッファー(pH 7.4)中に1 mg/m1濃度になるように溶解したものを用いた。

## 【0045】

(未反応マレイミド基のブロッキング)

基質ペプチドを固定化した表面をリン酸緩衝液で洗浄した後、未反応のマレイミド基をブロッキングするために、PEGチオール(日本油脂製SUNBRIGHTE(登録商標)MESH-50H)を1 mM濃度になるようにリン酸緩衝液(20 mMリン酸、150 mM NaCl; pH 7.2)に溶解して、300 μlをチップ上に注出し、室温で30分反応させた。ここで用いたPEGチオールの分子量は5,000である。

## 【0046】

(脱リン酸化の検出)

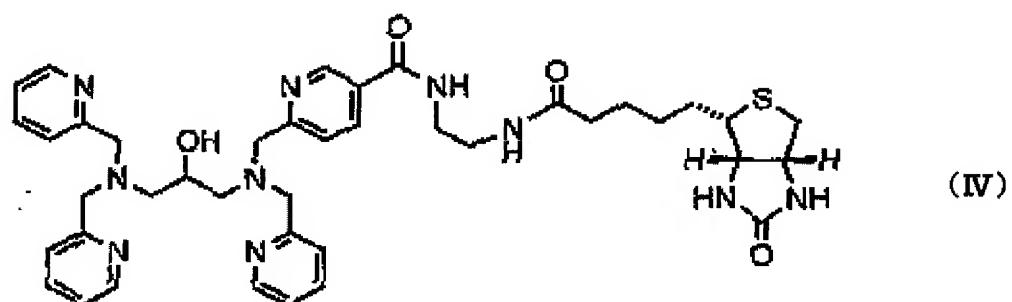
上記のようにブロッキングを行ったアレイをPBS及び水でアレイの洗浄を行い、PP2Aによる脱リン酸化を行った。PP2A溶液300 μlをアレイ上にドロップして、30°Cで脱リン酸化反応を行った。PP2A溶液は、PPase-2A(プロメガ製)を1ユニット/μl濃度になるように、50 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.5; 20 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、0.1 mg/m1濃度BSA含有)で希釈して用いた。

## 【0047】

上記のアレイをPBS、水の順で洗浄した後、ビオチン修飾ポリアミン亜鉛錯体を作成させた。ビオチン修飾ポリアミン亜鉛錯体としては、以下の式(IV)に示されるPhos-tag(登録商標)BTL-104(株式会社ナード研究所より購入)を用いた。Phos-tag(登録商標)BTL-104は25 μg/m1濃度とし、溶解液には0.005%Tween20、10%(v/v)エタノール、0.2M硝酸ナトリウム、1 mM硝酸亜鉛を含む10 mM HEPEs-NaOH緩衝液(pH 7.4)を用いた。作用は室温で1時間行った。

## 【0048】

【化6】



## 【0049】

次に、蛍光標識されたストレプトアビジン(以下、SAと示すこともある。)を作用させた。蛍光標識されたSAとしては、Alexa Fluor 532標識ストレプトアビジン(Molecular Probes製)を1 μg/m1濃度で用いた。蛍光標識SAのそれぞれの溶液を10 μg/m1濃度で15分間、室温で反応に用いた。反応溶液300 μlをアレイ上にドロップして溶液を広げて室温で30分間反応させた。

## 【0050】

上記アレイをPBS、水の順に洗浄して乾燥させ、蛍光イメージング解析を行った。アレイ解析に際しては、マイクロアレイスキャナGenePix4200AL(Axon Instruments製)を用いた。結果を図2に示した。脱リン酸化反応を行わない状態のアレイ(0分)においては、リン酸化ペプチドの固定化されているスポット(No

、1～4)において蛍光発色が見られ、非リン酸化ペプチドの固定化されているスポット(No. 5及び8)においては発色が見られていない。そして、PP2Aによる反応を行うことにより、PP2A基質の固定化されているスポット(No. 3及び4)においては、経時的に蛍光が消光していく様子が確認できた。なお、PTP $\beta$ の基質ペプチドが固定化されているスポット(No. 3及び4)においては、蛍光の変化がほとんど見られていない。したがって、PP2AによりOn-chipで脱リン酸化された基質の検出に成功できているものといえる。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0051】

本発明の方法により、特殊な技術を要することもなく、非常に簡便で迅速に様々なプロテインフォスファターゼ動態の解析を行うことが可能となった。キレート化合物を用いることにより、安価で取り扱いも容易であるうえに、リン酸化アミノ酸の種類やその近傍のアミノ酸配列による影響も受けない点でも従来の方法と比べて大きな優位性がある。本発明を利用することにより、特に多種類のプロテインフォスファターゼシグナルを網羅的に解析することができ、機能が未知な遺伝子の導入、あるいは薬物投与に伴う細胞内のプロテインフォスファターゼ動態を効果的にプロファイリングすることができる。これにより新規な遺伝子からの機能解析、新薬探索へのアプローチといったゲノム創薬への展開が期待され、産業界に寄与することが大である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0052】

【図1】実施例において作製されたアレイ上のペプチドの固定化パターンを示す図である。

。

【図2】実施例において、PKAによるOn-chipでの脱リン酸化に関するアレイ解析を行った結果を示す図である。

## 【図1】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
B	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5
C	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
D	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3
E	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2
F	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1
G	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
H	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5

1:(pY) 100  $\mu$ g/ml 4:(pS) 10  $\mu$ g/ml

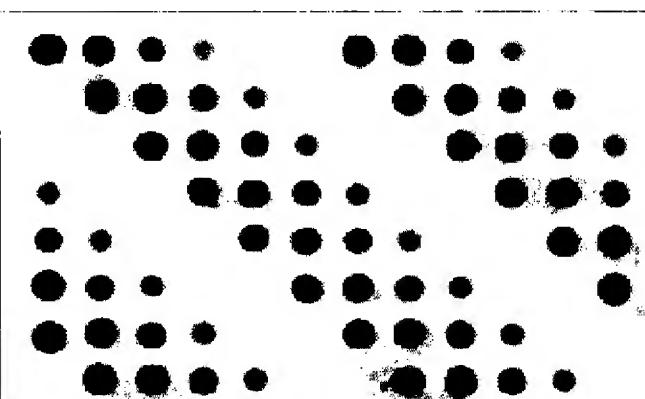
2:(pY) 10  $\mu$ g/ml 5:(S) 100  $\mu$ g/ml

3:(pS) 100  $\mu$ g/ml 6:(S) 10  $\mu$ g/ml

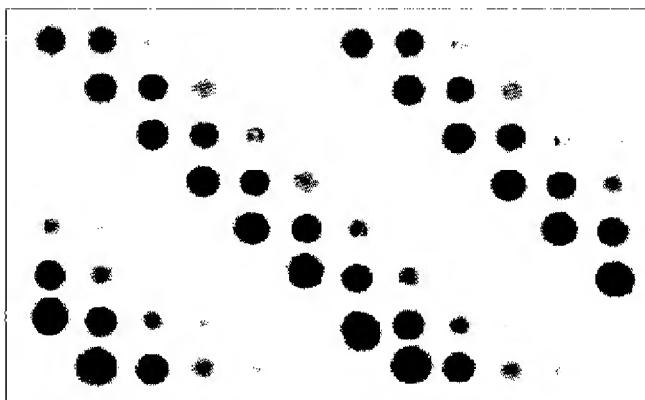
【図2】

## PP2A反応

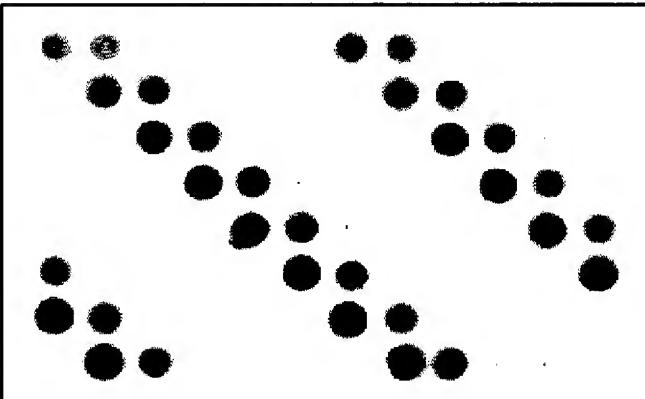
0分



15分



30分



【配列表】

2007228905000001.app

